Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Isolierung von Zellen aus soliden Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MANFRED LOCHER
aus Stuttgart

1965

8257

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

Isolierung von Zellen aus soliden Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
MANFRED LOCHER
aus Stuttgart

1965

Dekan:	Prof. Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. G. Weitzel
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. F. Lembeck

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

Herrn Professor Dr. Dr. G. Weitzel danke ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die großzügige Unterstützung der Untersuchungen.

Herrn Doz. Dr. F. Schneider danke ich für wertvolle Hinweise und einige Substanzen, Herrn Dr. J. Sander für technische Ratschläge.

Inhaltsverzeichnis

Einleitung 1

Material und Methoden 5

Beschreibung der Versuche 9

Ergebnisse 15

Besprechung der Ergebnisse und Diskussion 21

Natur der störenden schleimigen Substanz 21

Wirkungsweise der Pronase und Art des Zellzusammenhalts 23

Die Rolle der Calciumionen 25

Zellschäden durch Behandlung mit Enzymen 26

Einfluß von Zytostatika auf die anaerobe Glykolyse 27

Zusammenfassung 29

Literaturverzeichnis 3o

Lebenslauf 33

Einleitung

Einzelzellen, die aus einem festen Gewebe isoliert worden sind, lassen sich im Laboratorium für verschiedenartige Untersuchungen verwenden. Sie dienen zum Beispiel als Ausgangsmaterial für Gewebekulturen oder als Untersuchungsobjekt für die Manometrie nach Warburg. Ferner kann man Tumoren sehr einfach transplantieren, wenn man eine Suspension von Einzelzellen injiziert. Es kommt hinzu, daß Zellsuspensionen ein genaues quantitatives Arbeiten erlauben, da sich ihre Zellkonzentration im Gegensatz zu Gewebeschnitten sicher und rasch bestimmen läßt. Aus manchen Gewebearten, z. B. aus Knochenmark, sind keine Schnitte herstellbar. Eine Zellsuspension zeigte höhere Stoffwechselraten als Gewebeschnitte desselben Tumors (1). Die Schnittmethode gibt also ein weniger exaktes Bild von der biochemischen Dynamik der Einzelzelle.

Die älteste und am meisten angewandte Technik zur Herauslösung von Zellen aus einem Gewebe benutzt eine Salzlösung, der als wirksamer Bestandteil Trypsin zugesetzt ist (2). Bis in die jüngste Zeit wurden Variationen und neue Anwendungsmöglichkeiten dieser Methode in der Literatur beschrieben (z. B. 3, 4, 5). Jedoch ist die Trypsin-Anwendung mit Nachteilen behaftet, die sich in vielen Fällen störend bemerkbar machen. Der Abbau des Gewebes ist unvollständig und die Ausbeute an Zellen klein; die freigesetzten Zellen verkleben und bilden Flocken oder schleimige Klumpen. Um diese Mängel zu verhüten, sind verschiedene Wege be-

schritten worden. Suspensionsmedien wurden frei von Ca^{++} und Mg^{++} angesetzt, da diese Ionen den Gewebsverband festigen (1,6). Bei Versuchen mit Hyaluronidase wurden Calcium-Ionen, die während der Digestion aus dem Gewebe in das Suspensionsmedium übertraten, mit Zitrat abgefangen (7).

Trypsin wurde auch zusammen mit anderen Enzymen benutzt. Es wurde berichtet, Desoxyribonuklease löse den Schleim, der beim Trypsinieren entsteht,auf und hindere, schon zu Beginn des Experimentes zugefügt, die aus dem Gewebe herausgedauten Zellen am Verkleben (8,1). Neuroblasten von Heuschreckenembryonen und Zellen von Tiertumoren wurden mit einem Gemisch von Trypsin und Hyaluronidase gewonnen (9,1o). Es fiel immer wieder auf, daß unreine Präparate von Trypsin besser wirkten als kristallisiertes Trypsin (11). In diesem Sinne sind auch Beobachtungen zu verstehen, wonach Pankreatin erfolgreich Trypsin ersetzt (12,13). Als Hauptvorzug des Pankreatins wurde seine schleimlösende Wirkung genannt (14).

Auch ohne Mitwirkung von Trypsin wurde eine Reihe von Enzymen verwendet, um Zellen zu vereinzeln. Unter der Vorstellung, das Bindegewebe trage wesentlich zum Zusammenhalt der Zellen bei und liefere vielleicht das visköse Material, das isolierte Zellen zusammenballt, kann man Enzyme verwenden, die Bestandteile des Bindegewebes zerlegen. Mit folgenden Enzymen wurde in der Gewebezüchtung schon gearbeitet: Kollagenase (15,16), Elastase (17,18) und Hyaluronidase (7). Es stellte sich heraus, daß sich für Muskelgewebe die Kollagenase besser als Trypsin eignet. Die beiden proteolytischen Enzyme Pronase aus Streptomyces griseus (19) und Aspergillin-O aus Aspergillus oryzae (2o), deren Substratspezifität wesentlich breiter als die von Trypsin ist, wurden mit Erfolg verwandt, um von Säugetiergeweben Kulturen anzulegen

und Subkulturen weiterzuzüchten. An Pronase wird gelobt, daß sie Fragmente von 13-Tage-alten Mäuseembryonen sowie von Lungen- und Nierengewebe ausgewachsener Mäuse rasch und vollständig verdaute und monodisperse Zellsuspensionen bildete. Die Autoren empfehlen, die allgemeine Brauchbarkeit der Pronase noch an Geweben anderer Tierarten zu prüfen. Dieser Aufforderung kommt die hier vorliegende Arbeit nach, in der das Yoshida-Sarkom der Ratte benutzt wird.

Auch eine nicht-enzymatische Substanz wurde herangezogen, um Zellen für die Gewebekultur zu gewinnen. Es war herausgefunden worden, daß Askorbinsäure die Viskosität von Mucopolysacchariden herabsetzt. Dabei werden die Polymeren in kleinere Bruchstücke gespalten (21). Diese Eigenschaft der Askorbinsäure wurde ausgenutzt, um Mukosazellen aus dem Gastrointestinaltrakt in Suspension zu bringen (22).

Bei Forschungen über die Art der Bindung zwischen den Zellen wurde noch eine Reihe von Naturstoffen und synthetischen Substanzen auf ihre Fähigkeit untersucht, den Zusammenhalt benachbarter Zellen zu schwächen. Es sind dies: Lezithinase A, Chondroitinsulfat-Depolymerase, saure und alkalische Phosphatase, Neuraminidase, Schlangengift, Oxalat, Desoxycholat, Digitonin, Chelatbildner wie Äthylendiamin-tetraacetat, das Detergens Tween 2o,4o,6o und 8o (23, 24,25,26,27). Diese Stoffe haben in die Laboratorien für Gewebezüchtung wohl aus zwei Gründen keinen Eingang gefunden: Weil sie zu wenig wirken und weil sie die Zelle schädigen. Parenchymzellen aus Lebern, die mit einem Chelatbildner durchströmt worden waren in der Absicht, das Gewebe aufzulockern, erschienen zwar morphologisch unversehrt, zeigten aber bei der biochemischen Analyse, daß wichtige intrazelluläre Bestandteile herausgelaugt worden waren (25). Z. B. bindet Komplexon III, das Dinatriumsalz der Äthylendiamin-

tetraessigsäure, die zweiwertigen Kationen der lebenswichtigen Elemente Calcium, Magnesium, Mangan, Eisen, Kobalt.

Rein mechanische Methoden ergeben bei weichen Geweben zuweilen eine gute Ausbeute an Zellen. Der Anteil an lebenden Zellen ist gewöhnlich gering. Eine Siebmethode lieferte mehr als zwei Drittel tote Zellen (28). Wurden Gewebe in feine Teile zerschnitten und in einer Pufferlösung ohne Enzyme gerührt, so fanden sich am Ende der Prozedur bis zu 5o % abgestorbene Zellen. Sobald die Autoren Trypsin und Desoxyribonuklease in den Puffer gaben, erhielten sie nur lebende Zellen (1).

Auf Grund dieser Untersuchungsergebnisse wird in der hier vorgelegten Arbeit darauf verzichtet, rein mechanische Verfahren zur Zelldispersion auszuwerten. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es vielmehr, mit biochemischer Methodik solide Tumoren in Suspensionen von Einzelzellen umzuwandeln. Daher wurden einige der oben genannten Methoden auf das Yoshida-Sarkom der Ratte und auf menschliche Mamma- und Ovarialkarzinome angewandt. Im Anschluß daran wurde ein eigener Weg beschritten, der sich im Gegensatz zu den oben zitierten Methoden beim Yoshida-Sarkom bewährte. Dabei fanden sich experimentelle Hinweise auf Ursprung und Natur des störenden Schleims, der beim Trypsinieren entsteht. Die anaerobe Glykolyse einer Yoshida-Zell-Suspension wurde ohne und mit zytostatischen Verbindungen im Warburg-Apparat gemessen.

Material und Methoden

Balanced salt solution nach Gey (29)

$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	0.603 g
$NaHCO_3$	0.500 g
NaCl	16.000 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0.420 g
KH_2PO_4	0.050 g
KCl	0.750 g
$CaCl_2$	0.550 g
10%ige Dextroselösung	40.000 ml
Aq. bidest. ad	2000.000 ml

Phosphatpuffer (30)

0.164 M NaH_2PO_4

0.630 M NaOH

in verschiedenen Mischungsverhältnissen, je nach gewünschtem pH-Wert.

Puffer nach Earle, mod. v. Madden und Burk (1)

NaCl	6.8 g
KCl	0.4 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0.2 g
$NaHCO_3$	2.2 g
Dextrose	3.0 g
Aq. bidest. ad	1000.0 ml

Phosphatpuffer nach Dulbecco und Vogt (3)

NaCl	8.oo g
KCl	o.2o g
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	1.15 g
KH_2PO_4	o.2o g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	o.1o g
Aq. bidest. ad	1ooo.oo ml

Glycinpuffer (3o)

Glycin	o.85 g
NaCl	o.5o g
$NaHCO_3$	o.1o g
Aq. bidest. ad	11o.oo ml
0.2 n NaOH	1.oo ml

Weitere Lösungen

Eagle's basal medium (34)

Ringerlösung

Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer (31)

Kälberserum

Seretin (R), Konserve aus Humanserum (Behringwerke A.G., Marburg-Lahn)

Traubenzuckerlösung 1o % (M. Woelm, Eschwege)

Karzinostatika

N-Hydroxymethyl-succinimid (32)

2-(Hydroxymethyl-mercapto)-imidazol (32)

Mukolytische Substanz

N-Acetyl-Cystein

Die drei letztgenannten Substanzen wurden in dankenswerter Weise von Herrn Doz. Dr. F. Schneider (Physiologisch-chemisches Institut Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Enzyme

Trypsin, für analytische Zwecke (Boehringer)

Kollagenase, B grade (Calbiochem)

Desoxyribonuklease I, B grade (Calbiochem)

Hyaluronidase, Kinetin (R) (Schering AG, Berlin)

Ribonuklease, für analytische Zwecke (Boehringer)

Pankreatin, B grade (Calbiochem)

Pronase, B grade (Calbiochem)

Alkalische Phosphatase, gereinigt (Boehringer)

Boehringer: C.F. Boehringer & Söhne GmbH Mannheim

Calbiochem: California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles

Detergentien

Praestabitöl V (Chemische Fabrik Stockhausen & Cie., Krefeld)

Tween 8o, Oleylsorbitan-polyäthylen-glykol-äther, rein (Serva Entwicklungslabor, Heidelberg)

Tiere

Albinoratten, Inzuchtstamm, weiblich, 3 bis 4 Monate alt (Fa. Ivanovas, Kisslegg)

Albinomäuse, Inzuchtstamm, weiblich, 8 bis lo Wochen alt (Fa. Ivanovas, Kisslegg)

Tumoren

Yoshida-Sarkom der Ratte, feste Form

Ehrlich-Aszites-Karzinom der Maus

Menschliche Mammakarzinome (in dankenswerter Weise von der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen überlassen)

Menschliche Ovarialkarzinome (in dankenswerter Weise von der Universitätsfrauenklinik Tübingen überlassen)

Apparate

Tischzentrifuge Rotofix II (Fa. A. Hettich, Tuttlingen)

Warburg-Apparat (Fa. B. Braun, Melsungen)

pH-Meter 22 (Fa. Radiometer, Kopenhagen)

Beschreibung der Versuche

Isolierung der Zellen

Das Yoshida-Sarkom wurde gezüchtet, indem zwei Tumorstückchen im Durchmesser von etwa 3 mm Ratten in Äther-Narkose unter die Rückenhaut implantiert wurden. Nach 16 bis 2o Tagen wurden die Tiere getötet. Der Tumor wurde sofort exzidiert und von Bindegewebe, Muskulatur und Nekrosen befreit. Ein abgewogenes Tumorstück, suspendiert in Pufferlösung, um Austrocknung zu verhüten, wurde mit einer Irisschere solange zerschnitten, bis Stückchen im Durchmesser von 1 mm entstanden waren. Das Suspensionsmedium enthielt die aktive Substanz, z. B. Trypsin, in der unten angegebenen Konzentration. Auf 1 g Tumor kamen lo ml Lösung. Bei Pronase kann man auch die doppelte Tumormenge nehmen. Am Ende der Versuchsreihe zeigte es sich, daß die anaerobe Glykolyse höhere Werte erreicht, wenn schon der Dispersionslösung Glukose zugesetzt wird. Es wurden dann regelmäßig o.25 ml lo %ige Dextroselösung zu lo ml Dispersionslösung pipettiert. Die Versuche wurden, wenn unten nicht anders bemerkt, bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Nach der Zerkleinerung des Tumors wurde die Suspension 3o min. stehen gelassen und gelegentlich mit einem Glasstab umgerührt. Anschließend wurde der Überstand abgeschüttet und verworfen, da er gewöhnlich einen bedeutenden Anteil an toten Zellen enthält (1). Zu den am Boden des Becherglases liegenden Tumorstückchen wurden jetzt frische Pufferlösung mit aktiver Substanz und Glukoselösung in der oben genannten Menge gegeben. Die Suspension wurde mit einem Magnetrührer 3o min. lang bewegt und dann durch ein Blatt porösen Zellstoffs geseiht. Die durchgeseihte Flüssigkeit wurde lo min. bei 6oo U. p. m. zentrifugiert, der Überstand abgekippt und verworfen und der am Boden sitzende

Zellbrei mit dem gewünschten Puffer verdünnt. Die Resuspension gelang am besten, wenn die Flüssigkeit mit einer Pipette, auf die ein Gummiballon aufgesetzt war, angesogen und wieder zurückgespritzt wurde. Auf diese Weise wurden die Tumorzellen aufgewirbelt. Die Zellkonzentration wurde in Kaffka-Röhrchen bestimmt, die mit 1 ml Zellsuspension beschickt und 15 min. lang bei 12oo U. p. m. zentrifugiert wurden. Ein Skalenteil bedeutet ein Volumen von 2 mm^3 Zellen. Menschliche Tumoren wurden kurz nach der operativen Entfernung in derselben Weise verarbeitet, wie sie für das Yoshida-Sarkom geschildert wurde.

Am Ende eines jeden Versuches wurde ein Tropfen der Zellsuspension unter das Lichtmikroskop gebracht. In mehreren Gesichtsfeldern wurde geprüft, ob die Zellen einzeln liegen und eine unversehrte Form aufweisen. Teilweise wurde die Fähigkeit der Zellen zur anaeroben Glykolyse und die Hemmbarkeit der Glykolyse durch Karzinostatika untersucht.

Ansätze mit je 1 g Yoshida-Sarkom

1.

1o.o ml o.25 % Trypsin in Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer (pH 7.8)
Resuspension im selben Puffer

2.

1o.o ml o.25 % Trypsin und o.2o % Glukose in Ringerlösung und NaH_2PO_4-NaOH-Puffer (1 : 1, pH 6.7o)
Resuspension in derselben Lösung

3.

1o.o ml o.25 % Trypsin und o.2o % Glukose in Ringerlösung und NaH_2PO_4-NaOH-Puffer (1 : 1, pH 6.oo)
Resuspension in derselben Lösung

4.

lo.o ml o.25 % Trypsin in Puffer nach Earle (mod.)

6 Tropfen o.o4 % Desoxyribonuklease im selben Puffer

Resuspension in 2.o ml desselben Puffers und 1 Tropfen Desoxyribonuklease

Ansatz und Vorgehen nach (1)

5.

lo.o ml o.25 % Trypsin in Puffer nach Earle (mod.)

o.6 ml o.2o % Desoxyribonuklease im selben Puffer

Resuspension im selben Puffer mit Desoxyribonuklease

6.

lo.o ml o.25 % Trypsin in Ringerlösung und NaH_2PO_4-NaOH-Puffer (1 : 1, pH 6.7o)

6 Tropfen o.o4 % Ribonuklease im selben Puffer

Resuspension im selben Puffer mit Ribonuklease

7.

lo.o ml o.3o % Trypsin in Puffer nach Dulbecco und Vogt

1.o ml o.o4 % Desoxyribonuklease im selben Puffer

1.o ml o.o8 % Ribonuklease im selben Puffer

Resuspension im selben Puffer mit Desoxyribonuklease und Ribonuklease

8.

lo.o ml o.5 % Kollagenase in Puffer nach Gey

Resuspension im selben Puffer

9.

lo.o ml o.5 % Kollagenase in Puffer nach Gey

1.o ml Kälberserum

Resuspension in Ringerlösung

Ansatz und Vorgehen nach (16)

lo.

lo.o ml o.5 % Kollagenase in Ringerlösung und NaH_2PO_4-NaOH-Puffer (1 : 1 , pH 6.75)

Resuspension in derselben Lösung

11.

lo.o ml o.25 % Kollagenase in Ringerlösung und NaH_2PO_4-NaOH-Puffer (1 : 1, pH 6.o2)

Resuspension in derselben Lösung

12.

lo.o ml o.2o % Trypsin und o.2o % Kollagenase in Puffer nach Dulbecco und Vogt

Resuspension im selben Puffer

13.

lo.o ml o.25 % Trypsin und 15o I.E. Hyaluronidase in Puffer nach Dulbecco und Vogt

Resuspension im selben Puffer

14.

lo.o ml o.25 % Pronase in Puffer nach Dulbecco und Vogt

Resuspension in 5 ml desselben Puffers mit 15o I.E. Hyaluronidase

15.

lo.o ml o.2o % alkalische Phosphatase in Glycinpuffer (pH 7.8, Mg^{++} $5 \cdot 10^{-3}$ M)

Resuspension im selben Puffer

16.

lo.o ml o.25 % Trypsin und o.2o % alkalische Phosphatase in Glycinpuffer (pH 7.8, Mg^{++} $5 \cdot 10^{-3}$ M)

Resuspension im selben Puffer

17.

lo.o ml o.25 % Pankreatin in Puffer nach Earle (mod.)

Resuspension im selben Puffer

18.

lo.o ml o.25 % Pronase in Puffer nach Dulbecco und Vogt

Resuspension in Eagle's basal medium mit lo % Kälberserum

Ansatz und Vorgehen nach (19)

19.

lo.o ml o.25 % Pronase in Puffer nach Dulbecco und Vogt
6 Tropfen o.o4 % Desoxyribonuklease im selben Puffer
Resuspension in 5 ml desselben Puffers mit 3 Tropfen
o.o4 % Desoxyribonuklease

2o.

lo.o ml o.25 % Pronase in Puffer nach Dulbecco und Vogt
o.5 ml o.2o % Desoxyribonuklease im selben Puffer
o.25 ml lo %ige Dextroselösung
Resuspension in Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer mit o.ol %
Desoxyribonuklease

21.

lo.o ml 1 % Tween 8o in Puffer nach Earle (mod.)
Inkubation im Warburg-Apparat bei 37° C,
3o min. in Ruhe und 6o min. unter Schütteln
Resuspension in derselben Tween-Pufferlösung
Ansatz und Vorgehen entspricht (27).

22.

lo.o ml 5 % Praestabitöl V in Puffer nach Earle (mod.)
Inkubation im Warburg-Apparat bei 37° C,
3o min. in Ruhe, 3o min. unter Schütteln
Es bildet sich eine Gallerte. Keine Ausbeute an Zellen.

23.

lo.o ml 1 % N-Acetyl-cystein in Puffer nach Dulbecco und Vogt
o.2 ml lo %ige Dextroselösung
Resuspension im selben Puffer

24.

lo.o ml o.25 % Trypsin und 1 % N-Acetyl-cystein in Puffer
nach Dulbecco und Vogt
o.2 ml lo %ige Dextroselösung
Resuspension im selben Puffer

Ansätze mit Ehrlich-Aszites-Krebszellen

1.

o.5 g abzentrifugierte Zellen

lo.o ml o.25 % Trypsin in Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer

2.

o.5 g abzentrifugierte Zellen

lo.o ml Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer

Ansatz zur manometrischen Messung der anaeroben Glykolyse von Yoshida-Sarkomzellen

l.o ml Tumorzellsuspension. Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer nach (31), aber mit der doppelten Menge Natriumbikarbonat, da das Endvolumen 5o % Humanserum enthielt (33). Die Tumorzellsuspension enthielt o.ol % Desoxyribonuklease.

l.o ml Humanserum mit Zusatz eines Karzinostatikums.

o.l ml lo %ige Dextroselösung

Vor Beginn des Versuches wurden die Reaktionsgefäße lo min. lang mit einem Gasgemisch von 5 % Kohlendioxyd und 95 % Stickstoff unter Schütteln im Wasserbad durchströmt. Die Versuchsanordnung lehnte sich an (31) und (33) an.

Versuchsdauer: 6o min.

Temperatur: 37° C

Amplitude: 4 cm

Schüttelfrequenz: 8o/min.

Ergebnisse

Zuerst wurde mit den üblichen Methoden versucht, aus menschlichen Tumoren eine homogene Einzelzellsuspension zu gewinnen. Wenn man eine Lösung von Trypsin und Desoxyribonuklease oder von Kollagenase auf Gewebeteilchen von Mammakarzinomen und Ovarialkarzinomen einwirken ließ, wurde bei Resuspension der abzentrifugierten freigesetzten Zellen eine Mischung von Flokken und Einzelzellen erhalten. Die Flocken waren makroskopisch zu sehen. Ein Blick durch das Mikroskop bewies, daß sie aus Zellen bestanden. Die Ausbeute an isolierten Zellen lag sehr niedrig.

Das Verfahren mit Trypsin und Desoxyribonuklease, das Boyse (8) sowie Madden und Burk (1) auf verschiedene menschliche und tierische Geschwülste mit Erfolg anwandten, bewährte sich in der hier vorgelegten Arbeit auch nicht beim Yoshida-Sarkom der Ratte, das bei allen im folgenden geschilderten Experimenten benutzt wurde. Hier war zwar die Ausbeute an Zellen höher als bei den menschlichen Tumoren, aber schon beim Rühren ballten sich die Tumorbröckel zusammen und umgaben sich mit einer glasigen zähen Masse. Selbst wenn die Konzentration der Desoxyribonuklease um eine Zehnerpotenz erhöht wurde, wurde der schleimlösende Effekt nicht deutlicher. Madden und Burk (1) berichteten, daß die glasige, fadenziehende Masse, die beim Trypsinieren gebildet wird, unter der Wirkung von Desoxyribonuklease in Sekundenschnelle verschwindet. Den beiden Enzymen Trypsin und Desoxyribonuklease wurde in der hier vorgelegten Arbeit versuchsweise noch Ribonuklease beigegeben, was aber an den geschilderten Verhältnissen nichts änderte. Die Fäden und Flocken erschienen sofort, wenn die abzentrifugierten Zellen in einer Lösung von Desoxyribonuklease oder Ribonuklease oder von beiden Enzymen zusammen

wieder aufgeschlämmt wurden.

Das mikroskopische Bild zeigte nach der Anwendung von Kollagenase, daß die Yoshida-Zellen unmittelbar aneinander klebten und nur von wenigen Fäden durchzogen waren, nach der Anwendung von Trypsin, daß die Zellen in eine unförmige, glasige Substanz eingehüllt und mit ihr durchmischt waren; hier und dort hoben sich kurze, schmale Stränge aus der sonst strukturlosen Masse heraus. Eine Versuchsanordnung, die Kollagenase und Trypsin kombinierte, zeitigte denselben Mißerfolg.

Da die Desoxyribonuklease das visköse Material bei der Trypsinierung etwas verringerte, lag es nahe, in der Verdauungsflüssigkeit nach Bruchstücken der Desoxyribonukleinsäure zu fahnden. Nachdem die Tumorbröckel eine Stunde lang in der Enzym-Pufferlösung gerührt worden waren, wurde die Flüssigkeit durchgeseiht und 15 min. lang bei 1200 U. p. m. zentrifugiert. Im Überstand, der frei von Gewebeteilchen, Zellen und Schleim war, fand sich ein hoher Gehalt an Desoxyribonukleotiden. (Für die technische Ausführung der DNS-Analyse wird Herrn Dr. K. Seynsche gedankt.)

Die Konsistenz des Schleimes war am zähesten und die Masse am größten, wenn Trypsin allein benutzt wurde und wenn der biologische pH-Wert etwas zum Alkalischen verschoben war, z. B. in Krebs-Ringer-Bikarbonatlösung von pH 7.8. Unter dem Einfluß von Desoxyribonuklease und Kollagenase bildete sich etwas weniger Schleim, ebenso bei niedrigeren pH-Werten. Deswegen wurde systematisch die Zelldispersion mit Puffern von verschiedenem pH-Wert untersucht, mit Phosphatpuffer von pH 6.7 und pH 6.0. Da dem Phosphatpuffer, der aus primärem Natriumphosphat und Natronlauge hergestellt wurde, lebenswichtige Ionen fehlten, wurde er 1 : 1 mit Ringerlösung versetzt. Dem Lösungsmittelgemisch wurde entweder Kollagenase oder

Trypsin zugefügt. Der pH-Wert wurde am Anfang und Ende des Versuches kontrolliert. Während des Versuches fiel er gewöhnlich um einen geringen Betrag (0.1) ab. Auch in diesem unphysiologisch sauren Milieu kamen jedoch die Zellen nicht in monodisperser Phase vor. Eine praktische Anwendungsmöglichkeit ergab sich aus dieser Versuchsanordnung nicht, selbst wenn ihr zugute gehalten wird, daß höhere Konzentrationen von Wasserstoffionen in Geweben von bösartigen Geschwülsten ohnehin vorkommen können.

Die Kombination von Trypsin und Hyaluronidase lieferte eine mäßige Ausbeute an Zellen, die nach Resuspension in Phosphatpuffer nach Dulbecco-Vogt Aggregate in Form von Flocken und Fäden bildeten. Zellen, die mit Pronase gewonnen worden waren, flockten bei der Resuspension in Phosphatpuffer trotz der Zugabe von Hyaluronidase aus.

Eine Arbeit von Berwick und Coman (24) war der Anlaß, alkalische Phosphatase zur Zellvereinzelung einzusetzen. Die beiden Autoren hatten beobachtet, daß dieses Enzym die Stärke des Zellzusammenhanges und die Klebrigkeit der Zellen gegenüber silikonisiertem Glas verminderte. In der hier vorgelegten Arbeit wurden Zellen des Yoshida-Sarkoms durch alkalische Phosphatase in Glycin-Puffer in mäßiger Menge freigesetzt. Sie flockten bei Resuspension im selben Puffer teilweise aus. Das mikroskopische Bild zeigte unauffällige und zerfallende Zellen. Zusatz von Trypsin steigerte die Ausbeute; auch lösten sich die Fäden bei Resuspension in Glycinpuffer nach lo min. auf. Jedoch wiesen viele Zellen neben den Zerfallserscheinungen Pseudopodien auf. Ein Phosphatpuffer kam für den Versuch nicht in Frage, da Phosphationen die Phosphatase hemmen. Die Magnesiumionen dienten der Aktivierung des Enzyms.

Der nächste Versuch wurde mit Pankreatin gemacht. Die Zellen, die nach der Einwirkung des Enzyms den Zellverband verlassen hatten, klumpten in Earle's Puffer zu einem großen, schleimigen Gebilde zusammen. Im Mikroskop waren, eingebettet in glasigen Schleim, unauffällige Zellen und Zellen mit Vakuolen im Zytoplasma zu erkennen.

Das letzte Enzym, das in die Untersuchungen einbezogen wurde, war Pronase. (Für den Rat dazu wird Herrn Prof. Dr. Gottschalk, MPI, Tübingen, gedankt.) Es handelt sich um eine Breitspektrum-Protease aus Streptomyces griseus. Die Arbeitsvorschrift, die Gwatkin und Thomson (19) gegeben haben,wurde zunächst befolgt. Auch nach zweistündiger Verdauung waren die Gewebsbröckel ebensowenig wie bei den Ansätzen mit anderen Enzymen völlig in Einzelzellen zerlegt. Die durch Pronase freigesetzten, durchgeseihten und abzentrifugierten Zellen wurden in Eagle's Puffer mit lo % Kälberserum resuspendiert. Die Zellen klebten teilweise zusammen und bildeten Fäden. Das Ausmaß der Zellaggregation war jedoch geringer als bei Trypsin. Wenn die Zellaggregate entfernt wurden, entstanden aus der zunächst homogenen Suspension neue. Das mikroskopische Bild zeigte fast nur Zellen, die gut erhalten waren.

Schließlich wurde noch versucht, die Funktion der Pronase durch einen Zusatz von Desoxyribonuklease zu verbessern. Diese Kombination ist in der Literatur noch nicht beschrieben. 6 Tropfen o.o4 %ige Desoxyribonuklease auf lo ml Phosphatpuffer nach Dulbecco-Vogt, in dem 25 mg Pronase gelöst waren, und bei der Resuspension 3 Tropfen Desoxyribonuklease auf 5 ml Phosphatpuffer brachten keinen Erfolg. Wurde die Konzentration der Desoxyribonuklease erhöht (o.5 ml o.2 %ig bei der Dispersion und der Resuspension), so blieben die Tumorzellen in monodisperser Phase. Die Gewebeteilchen verklebten

zum Teil während der Dispersion, was wohl darauf zurückzuführen ist, daß die Pronase die beigegebene Desoxyribonuklease angreift. Selbst mit Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer, in dem die Zellen eine besonders große Neigung aufweisen, sich zusammenzuballen, wurde eine homogene Zellsuspension erhalten, wenn Desoxyribonuklease in einer Konzentration von o.ol % anwesend war.

Die Versuche mit Detergentien wurden durch eine Arbeit von Yamada angeregt, der sich mit dem Mechanismus der Tumormetastasierung beschäftigte (27). Er fand, daß Tween die Tumorzellen voneinander trennte. In der hier vorgelegten Arbeit war die Zellausbeute mit Tween nur mäßig. Die Zellen, die nach der Isolierung wieder in Earle's Lösung mit und ohne Tween suspendiert wurden, lagen zum großen Teil in flockiger Form vor. Das mikroskopische Bild läßt sich folgendermaßen beschreiben: Zellpakete, eingehüllt und durchsetzt von Schleimmassen, die teilweise eine fädige Struktur aufweisen. In einer Lösung von Praestabitöl V entstand schon aus dem kleingeschnittenen Tumor eine Gallerte.

Die mukolytische Substanz N-Acetyl-cystein führte zusammen mit Trypsin makroskopisch zu einer homogenen Suspension, mikroskopisch zu auffallend gekörnten, schattenhaften Zellen, teilweise in kleinen Klumpen, zu zerfallenden Zellen und Zelltrümmern. Ohne Trypsin war die Anzahl erhaltener Zellen höher und ihre Kontur schärfer gezeichnet, sonst aber kein Unterschied erkennbar. Die Resuspension erfolgte in Phosphatpuffer nach Dulbecco und Vogt.

Ehrlich-Aszites-Krebszellen, die eine Stunde lang in Krebs-Ringer-Bikarbonatpuffer mit o.25 % Trypsin unter Rühren inkubiert wurden, ergaben schleimige Klumpen. Im Mikroskop sah man gut erhaltene Zellen, die teils verklumpt,

teils frei schwimmend waren. Eine fädige oder amorphe Interzellularsubstanz war nicht zu entdecken. Bei einem Parallelansatz, der kein Trypsin enthielt, blieb die Zellsuspension völlig homogen.

Bei der Messung der anaeroben Glykolyse von Yoshida-Sarkomzellen wurden folgende Werte erhalten:

Ansatz	$Q_{CO_2}^{N_2}$	% Restgärung
Kontrolle	4.4	1oo
A, $5 \cdot 1o^{-4}$ M	2.6	58
B, $5 \cdot 1o^{-4}$ M	2.5	57
A, $1o^{-4}$ M	3.2	72
B, $1o^{-4}$ M	3.3	72

Dabei bedeuten:

Ansatz A : Yoshida-Sarkomzellen in Serum-Puffer mit N-Hydroxymethylsuccinimid in der oben angegebenen Konzentration

Ansatz B : Yoshida-Sarkomzellen in Serum-Puffer mit 2-(Hydroxymethyl-mercapto)-imidazol in der oben angegebenen Konzentration

$Q_{CO_2}^{N_2}$: mm^3 gebildetes CO_2/mm^3 Zellen/h

Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte, die aus 1o Messungen an 5 verschiedenen Yoshida-Sarkomen der Ratte gewonnen wurden.

Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Natur der störenden schleimigen Substanz

Der Versuch, Gewebe in Zellen zu zerlegen, wird häufig dadurch vereitelt, daß Flocken oder hochvisköse Klumpen auftreten. Man hat daher nach der Natur der schleimigen Substanz zu fragen. Im Lichtmikroskop bietet sich folgendes Bild: Die Zellen haben sich zusammengeballt und sind von einer glasigen Masse umhüllt, oder aber die Zellen kleben zusammen, ohne daß eine Interzellularsubstanz innerhalb der durch Vergrößerung und optische Auflösung gegebenen Grenzen zu sehen ist. Die letztere Erscheinungsform beruht wohl darauf, daß die Menge des klebenden Stoffes nur gering ist.

Es wurde zunächst vermutet, der Schleim, der die Zellen aneinanderheftet, sei bindegewebiger Herkunft. Zweifel an dieser Vermutung entstanden, als Kollagenase und Hyaluronidase aus Stierhoden, die nicht nur Hyaluronsäure, sondern auch Chondroitin und Chondroitinsulfat spaltet, allein oder zusammen mit Trypsin die visköse Masse nicht beseitigten. Folgende Beobachtung bewies dann, daß das Bindegewebe nicht wesentlich an der Schleimbildung beteiligt sein kann: Ehrlich-Aszitezellen, die a priori als Einzelzellen vorliegen und als natürliche Suspension kein Bindegewebe enthalten, bildeten bei der Behandlung mit Trypsin ebenfalls schleimige Zellklumpen, während Zellen derselben Art, die unter sonst gleichen Bedingungen ohne Trypsin verarbeitet wurden, unverändert als homogene Zellsuspension verblieben.

Der mukolytische Effekt, den Desoxyribonuklease auf trypsinierte, zusammengeballte Zellen ausübt und der in der hier vorgelegten Arbeit, wenn auch in viel geringerem Ausmaß als von Boyse (8) und von Madden und Burk (1), beobachtet wurde,

ließ daran denken, daß Desoxyribonukleinsäure aus zerfallenden Zellen austritt und die bekannte schleimige Masse verursacht. Aus diesem Grund wurde die Konzentration der Desoxyribonukleinsäure in der Dispersionslösung, die Desoxyribonuklease enthielt, bestimmt. Die Konzentration lag hoch und machte die genannte Annahme sehr wahrscheinlich. Es herrschte damit Übereinstimmung mit den Verhältnissen bei trypsinierten Embryonen, die schon genauer untersucht worden sind. Auch bei embryonalen Zellen, die durch Trypsin voneinander getrennt werden, tritt ein visköses Material auf, das manche Spekulationen auslöste, um die Reaggregationsexperimente zu erklären (11). Zellen, die aus Extremitätenknospen von Hühnerembryonen freigesetzt wurden, sollen eine Substanz sezernieren, die als Mikromilieu dient und bei der Reaggregation als Interzellularsubstanz auftritt (35). L. Weiss glaubt, daß die mukoide Substanz die Zellen miteinander verkittet (36). Die chemische Analyse der Substanz führte Steinberg durch (37). Es handelt sich nach ihm um ein Gel, das sich aus hydratisiertem Desoxyribonukleoproteid zusammensetzt. Er nimmt an, daß die Chromosomen zerfallener Zellen die Quelle des Gels sind und daß das Trypsin die Eiweißkomponente des Desoxyribonukleoproteids teilweise abspaltet.

Es bleibt noch zu erklären, warum in der hier vorgelegten Arbeit die Kombination von Desoxyribonuklease mit Trypsin nur schwach mukolytisch wirkte, dagegen die mit Pronase stark. Trypsin und Pronase unterscheiden sich vor allem durch ihre Substratspezifität. Trypsin greift nur Peptidbindungen an, an denen die Karboxylgruppe von Arginin oder Lysin beteiligt ist. Die Substratspezifität der Pronase, die von Nomoto entdeckt und näher charakterisiert wurde (38), ist viel breiter. Dieses Enzym spaltet z. B. die Peptidbindungen von Kasein in einem Ausmaß, das 75 % des Säurehydrolysewertes beträgt. Dementsprechend wird

der Eiweißanteil des Desoxyribonukleoproteids durch Pronase wesentlich weiter abgebaut als durch Trypsin. Die Desoxyribonukleinsäure wird freigelegt und bietet jetzt der Desoxyribonuklease eine breite Angriffsfläche dar.

Warum liefert Trypsin, wenn es allein auf das Gewebe einwirkt, besonders viel visköses Material? Madden und Burk fanden in Parallelversuchen, daß in Ansätzen ohne Trypsin bis zu 5o % tote Zellen waren, in Ansätzen mit Trypsin aber alle Zellen lebten (1). Man muß annehmen, daß nekrosefreie Tumorstücke auch mikroskopisch geschädigte Zellen enthalten und daß weitere Zellen bei der mechanischen Zurichtung der Gewebeteilchen zu Schaden kommen. Diese Zellen werden von Trypsin aufgelöst, während ihm lebenskräftige Zellen widerstehen. Ob auch die lebenden Zellen bei der enzymatischen Isolierung gewisse Veränderungen erfahren, wird weiter unten besprochen.

Wirkungsweise der Pronase und Art des Zellzusammenhalts

Als nächste Frage ergibt sich aus den durchgeführten Versuchen: Durch welchen Reaktionsmechanismus setzt die Pronase die Zellen aus dem Gewebe frei? Für das Trypsin gibt es zwei Hypothesen (11), die ebenso für die Pronase gelten: Das Enzym baut entweder eine Zwischenzellsubstanz ab, die den Zusammenhang zwischen den Zellen aufrecht erhält, oder es wird an der Zelloberfläche adsorbiert, wodurch die Adhäsionskraft geschwächt wird. Im letzteren Fall ist anzunehmen, daß keine Interzellularsubstanz vorhanden ist, sondern daß die Zellen durch ein Gleichgewicht der anziehenden London-van der Waals'schen Kräfte und der abstoßenden elektrostatischen Kräfte in einem Abstand von 1oo-2oo Å fixiert werden, wie es Curtis (11) auf Grund der Verwey-Overbeek'schen Theorie der Stabilität lyophober Kolloide für die meisten Gewebe wahrscheinlich gemacht hat.

Eine dritte Hypothese wird durch einige experimentelle Befunde gestützt, die zeigen, daß der aktive Bereich des Trypsins für die Zelldispersion erforderlich ist. Trypsin, das durch Diisopropylfluorophosphat (39), Ovomukoid oder Sojabohneninhibitor (4o) inaktiviert wurde, löste keine Zellen los. Diese Befunde ändern zwar nichts an der dynamischen Theorie der Zelladhäsion von Curtis, machen es aber sehr wahrscheinlich, daß die Adsorption von Enzymmolekülen keine Rolle spielt, sondern daß Trypsin und Pronase die Zelloberfläche verändern und dadurch die Zellen voneinander trennen. In der Tat haben neben den Lipiden die Proteine hohe London-van der Waals'sche Konstanten (11). Nach der Danielli'schen Theorie besteht die Membran, die die Zelle umhüllt, aus drei Schichten: Einer inneren und einer äußeren Proteinschicht und einer mittleren bimolekularen Lipidschicht (41). Elektronenoptische Studien haben diese Theorie bestätigt (42, 43). Die äußere Schicht wird wohl von Proteasen angegriffen und denaturiert. Dadurch verliert sie ihre Fähigkeit, benachbarte Zellmembranen anzuziehen und festzuhalten.

In diesem Sinne sprechen auch Befunde, die von M. H. Moscona und A. A. Moscona erhoben wurden (44). Sie fanden, daß Puromycin, das die Eiweißsynthese hemmt, und Actinomycin D, das den Aufbau der Ribonukleinsäure verhindert, die Wiedervereinigung isolierter embryonaler Retinazellen unterdrücken. Wenn die de-novo-Synthese von Oberflächenproteinen, die bei der Zelldispersion denaturiert worden sind, unterbunden wird, fallen wichtige interzelluläre Adhäsionskräfte aus. Von dieser Funktion der Zellwand ist streng zu trennen die verklebende Wirkung des hydratisierten Desoxyribonukleoproteids, das aus zerfallenen Zellen stammt. Dementsprechend hat Coman festgestellt, daß Adhäsion und Klebrigkeit zwei unabhängige Eigenschaften der Zelloberfläche sind (45). Er glaubt, daß die

Klebrigkeit auf eine zähe Hülle um die Zelle zurückzuführen ist.

Der Yoshida-Tumor der Ratte bietet das typische Bild der Rundzellensarkome. Das sind zellreiche Geschwülste ohne spezifische Strukturen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen über das Yoshida-Sarkom liegen bis jetzt nicht vor, jedoch über einige Hepatome, die nach Yoshida morphologisch und biologisch mit seinem Sarkom verwandt sind (46). Z. B. wachsen beide Arten von Tumoren sowohl in flüssiger Aszitesform als auch in Form eines soliden Tumors. Essner hatte enzymatisch Tumorinseln des Aszites-Hepatoms zu Einzelzellen verdaut und daraus gefolgert, daß eine Zementsubstanz, die die Zellen zusammenhält, abgebaut wird (47). In elektronenoptischen Aufnahmen von Hepatomen wurde diese Interzellularsubstanz niemals gesehen (48). Das könnte allerdings auch an der Präparation der Gewebeschnitte liegen. Mercer und Shaffer glauben, daß die gegenwärtig zur Verfügung stehenden Färbemethoden die Interzellularsubstanz nicht adäquat darstellen (49). Wenn bei manchen Geweben gefärbtes Material zwischen den Zellen gesehen wurde, so kann es sich aber auch um ausgelaufene Bestandteile des Zellinneren handeln (11). Wenn man die verschiedenen Tatsachen und Hypothesen überblickt, so wird auch die Dispersion der Yoshida-Zellen am besten durch die Denaturierung von Zellwandproteinen erklärt, wie sie oben geschildert wurde.

Die Rolle der Calciumionen

In eigenen Experimenten am Yoshida-Sarkom wurde gezeigt, daß ein Zusatz von Calciumionen zum Phosphatpuffer nach Dulbecco und Vogt die Ausbeute an isolierten Zellen senkt. Nach einer weit verbreiteten Meinung verkettet das Calciumion benachbarte Zellen. Dabei ist an Strukturen zu denken wie:

$R_1 - COO^- \; Ca^{++} \; {}^-OOC - R_2$ (5o)

Entsprechend schwächen Stoffe, die Calcium aus dem Suspensionsmedium herausfangen und die Calcium fester binden als die biologischen Carboxyl- und Phosphatgruppen, den Zellzusammenhang. Die Theorie der Calciumbindung trifft aber nur in seltenen Fällen zu. Der Abstand von zwei Haftstellen, die durch ein Calciumion verknüpft sind, kann nicht mehr als 10 Å betragen (11). Der übliche Abstand zweier Zellen voneinander liegt aber in dem Bereich von 100 bis 200 Å (11). Das gilt nach den elektronenoptischen Erkenntnissen auch für die Hepatome, die mit dem Yoshida-Sarkom verwandt sind. An der Tatsache, daß Calcium das Gewebe stabilisiert, kann nicht gezweifelt werden. Eine gute Erklärung bieten Modellversuche, die Dan angestellt hat (51). Das Oberflächenpotential von Seeigeleiern fällt im selben Maß, wie die Ionenstärke im Suspensionsmedium wächst. Gleichzeitig wird die interzelluläre Adhäsion stärker, da die abstoßenden Kräfte der Zellwand abnehmen.

Zellschäden durch Behandlung mit Enzymen

Schließlich muß noch die Frage beantwortet werden, ob die Zellen während der Behandlung des Gewebes mit Enzymen Schäden erleiden. In der hier vorgelegten Arbeit erwiesen sich Zellen des Yoshida-Sarkoms, die mit Pronase und Desoxyribonuklease isoliert wurden, als geeignetes Substrat, um daran die anaerobe Glykolyse unter dem Einfluß verschiedener Stoffe zu messen. Gwatkin und Thomson (19), die in Parallelversuchen mit Pronase und Trypsin Zellen aus Mäusegeweben gewannen, stellten fest, daß die Zellen in beiden Fällen in der Kultur gleich gut wuchsen. Jedoch fiel es schon Rous und Jones (2) auf, daß Zellen, die im Gewebe nicht rund waren, in einer Lösung von Trypsin kugelig wurden. Wenn diese Zellen in Plasma inkubiert wurden, nahmen sie die ursprüngliche Gestalt wieder an. Auch Zellen, die Pronase ausgesetzt sind, runden sich ab.

Untersuchungen im elektronenoptischen Bereich liegen bis jetzt nur für Amnionzellen vor, die eine Stunde lang bei 37° C vorsichtig in einer o.25 %igen Trypsinlösung bewegt wurden (52). Zum Vergleich wurden unbehandelte Zellen herangezogen. Die trypsinierten Zellen zeigten Übergänge vom normalen Aussehen bis zum Zerfall. Typisch waren amöboide Zellen. Sie hatten die zottige Struktur verloren, durch die sich die Plasmamembran an der freien Seite der Amnionzellen in situ auszeichnet. Gleichzeitig waren endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat hypertrophiert, die Mitochondrien vergrößert, die Cristae mitochondriales vermindert, der Kern geschwollen und gelappt. Dieser Gestaltwandel wird von den Autoren als Anpassung der isolierten Zellen an die neuen Lebensbedingungen gedeutet. Ein Eindringen des Trypsins ins Zellinnere wird für unwahrscheinlich gehalten. Es ist aber ebenso gut möglich, daß die morphologischen Kennzeichen der trypsinierten Zelle auf Schäden an der Zelloberfläche beruhen, da Trypsin die Proteinbestandteile der Zellwand angreift und damit die Permeabilität verändert. Die Pronase, die aggressiver als das Trypsin ist, dürfte an der Zellstruktur mindestens ebenso viele Abweichungen von der Norm hervorrufen. Allerdings wurde in der hier vorgelegten Arbeit die Methode mit Pronase und Desoxyribonuklease nicht bei 37° C, sondern bei Zimmertemperatur angewendet, wo im Lichtmikroskop beschädigte Zellen selten zu sehen waren. Im Gegensatz dazu erbrachte ein Parallelversuch bei 37° C einen deutlichen Anteil an zerfallenden Zellen.

Einfluß von Zytostatika auf die anaerobe Glykolyse

Die beiden alkylierenden Zytostatika N-Hydroxymethylsuccinimid und 2-(Hydroxymethyl-mercapto)-imidazol setzten die anaerobe Glykolyse von Yoshida-Zellen in vitro herab. Dieses

Ergebnis stimmt im Prinzip mit den Befunden von Weitzel et al. (32) am Ehrlich-Aszitescarzinom überein. Folgende Unterschiede traten auf: Während bei 10^{-4} molarer Konzentration an den Ehrlich-Zellen keine Hemmung zu beobachten war, betrug die Restgärung der Yoshida-Zellen 72 %. Bei $5 \cdot 10^{-4}$ molarer Konzentration reagierten umgekehrt die Yoshida-Zellen weniger empfindlich auf die Hemmsubstanzen. Die Abweichungen der beiden Zelltypen voneinander sind also nicht einheitlich.

Zusammenfassung

Einige Methoden zur Isolierung von Einzelzellen aus soliden Tumoren wurden auf menschliche Tumoren und das Yoshida-Sarkom der Ratte angewandt. Die bisher noch nicht angewandte Kombination von Pronase und Desoxyribonuklease bewährte sich beim Yoshida-Sarkom, dessen Überführung in eine homogene Einzelzellsuspension ohne mukoides Material gelang.

Experimentell liess sich zeigen, daß das störende mukoide Material, das bei vielen Methoden anfällt, nicht bindegewebiger Herkunft ist, sondern aus Desoxyribonukleoproteid besteht. Calciumionen senkten die Ausbeute an isolierten Zellen.

Die anaerobe Glykolyse von Yoshida-Zellen, die nach der hier ausgearbeiteten Methode gewonnen wurden, liess sich durch N-Hydroxymethyl-succinimid und 2-(Hydroxymethyl-mercapto)-imidazol deutlich senken.

Die Wirkungsweise von Pronase und Desoxyribonuklease und die Rolle der Calciumionen werden im Zusammenhang mit den Theorien über die interzelluläre Bindung diskutiert.

Literaturverzeichnis

(1) Madden, R.E., and Burk, D., J. Nat. Cancer Inst. 27, 841 (1961)

(2) Rous, P., and Jones, F.S., J. Exptl. Med. 23, 549 (1916)

(3) Dulbecco, R., and Vogt, M., J. Exptl. Med. 99, 167 (1954)

(4) Youngner, J.S., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 85, 2o2 (1954)

(5) Terranova, T., und Gawehn, K., in O. Warburg, Weiterentwicklung der zellphysiologischen Methoden; Thieme, Stuttgart (1962)

(6) Pomerat, C.M., and Slick, W.C., Nature 198, 859 (1963)

(7) Segard, E., et al., Compt. Rend. 255, 1479 (1962)

(8) Boyse, E.A., Transpl. Bull. 26, 1oo (196o)

(9) St. Amond., G.S., and Tiptou, S.R., Science 119, 93 (1954)

(1o) Rinaldini, L.M.J., Internat. Rev. Cytol. 7, 587 (1958)

(11) Curtis, A.S.G., Biol. Rev. 37, 82 (1962)

(12) Vorontsov, I.V., et al., Bull. Exptl. Biol. Med. 49, 312 (196o)

(13) Hayashi, H., and Lo Grippo, G.A., Bacteriol. Proc. 62, 141 (1962)

(14) Hayashi, H., and Lo Grippo, G.A., J. Immunol. 9o, 956 (1963)

(15) Lasfargues, E.Y., Exptl. Cell Res. 13, 553 (1957)

(16) Cavanaugh, D.J., et al., Nature ?oo, 261 (1963)

(17) Rinaldini, L.M., Exptl. Cell Res. 16, 477 (1959)

(18) Fuzi, M., et al., Zentralbl. Bakt. Parasitenk. Infektionskrankh. u. Hyg. 177, 542 (196o)

(19) Gwatkin, R.B.L., and Thomson, J.L., Nature 2o1, 1242 (1964)

(2o) Sabina, L.R., et al., Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 114, 13 (1963)

(21) Robertson, W., et al., Biochem. J. 35, 9o3 (1941)

(22) Cowan, W.K., J. Pathol. Bacteriol. 84, 439 (1962)

(23) Terayama, H., Exptl. Cell Res. 28, 113 (1962)

(24) Berwick, L., and Coman, D.R., Cancer Res. 22, 982 (1962)

(25) Laws, J.O., and Strickland, L.H., Exptl. Cell Res. 24, 24o (1961)

(26) Owczarzak, A., and Dornfeld, E.J., Amer. Zool. 2, 435 (1962)

(27) Yamada, T., Z. Krebsforsch. 65, 75 und 87 (1962)

(28) Kaltenbach, J.P., and Kaltenbach, M.H., Ann. N.Y. Acad. Sc. 63, 977 (1956)

(29) Gey, G.O., and Gey, M.K., Am. J. Cancer 27, 1 (1936)

(3o) Hinsberg, K., und Lang, K., Med. Chem. f. d. klin. und theoret. Gebrauch. 3. A. Urban und Schwarzenberg, München-Berlin (1957)

(31) Umbreit, W.W., Burris, R.H., and Stauffer, J.F., Manometric Techniques. Burgess Publishing Co., Minneapolis (1957)

(32) Weitzel, G., Schneider, F., Fretzdorff, Anna-Maria, Seynsche, K., und Finger, H., Z. physiol. Chem. 334, 1 (1963)

(33) Weitzel, G., und Buddecke, E., Z. physiol. Chem. 323, 14 (1961)

(34) Eagle, H., Science 13o, 432 (1959)

(35) Moscona, A., in D. Rudnick, Developing cell systems and their control. New York. 196o

(36) Weiss, L., Int. Rev. Cytol. 9, 187 (196o)

(37) Steinberg, M.S., Exptl. Cell Res. 3o, 257 (1963)

(38) Nomoto, M., et al., J. Biochem. 46, 653, 839, 1481, 1645 (1959); 48, 453, 593, 9o6 (196o)

(39) Easty, G.C., and Mutolo V., Exptl. Cell Res. 21, 374 (196o)

(4o) Moscona, A.A., Nature 199, 379 (1963)

(41) Danielli, J., Cold Spring Harbor Symp. 6, 19o (1938)

(42) Stoeckenius, W., Circulation 26, 1o66 (1962)

(43) Gray, E.G., Endeavour 23, 61 (1964)

(44) Moscona, M.H., and Moscona, A.A., Science 142, 1o7o (1963)

(45) Coman, D.R., Cancer Res. 21, 1436 (1961)

(46) Lettré, H., Z. Krebsforsch. 59, 287 (1953)

(47) Essner, E., et al., Exptl. Cell Res. 7, 43o (1954)

(48) Usui, T., and Kaziwara, K., Ann. Rep. Takeda res. Lab. (Osaka) 19, 19o (196o). Zitiert bei (27)

(49) Mercer, E.H., and Shaffer, B.M., J. biophys. biochem. Cytol. 7, 353 (196o)

(5o) Abercrombie, M., and Ambrose, E.J., Cancer Res. 22, 525 (1962)

(51) Dan, K., Biol. Bull., Woods Hole, 93, 259 (1947)

(52) Edwards, G.A., and Fogh, J., Cancer Res. 19, 6o8 (1959)

Lebenslauf

Am 29. März 1935 wurde ich in Stuttgart geboren als Sohn des Oberstudiendirektors Alfred Locher und seiner Ehefrau Emma, geb. Schelling. Von 1941 bis 1946 besuchte ich die Volksschule in Stuttgart und Munderkingen (Donau), von 1946 bis 1950 die Lateinschule in Munderkingen, von 1950 bis 1955 das humanistische Gymnasium in Ehingen (Donau), an dem ich 1955 die Reifeprüfung ablegte.

Ich begann 1955 das Medizinstudium an der Universität Heidelberg und bestand dort 1958 die ärztliche Vorprüfung. Nach Semestern an den Universitäten Zürich und München studierte ich von 1959 bis 1961 an der Universität Tübingen, an der ich 1961 das medizinische Staatsexamen machte.

Von 1962 bis 1964 verbrachte ich meine Medizinalassistentenzeit an der Chirurgischen Klinik, der Frauenklinik, der Medizinischen Klinik und dem Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen. Nach der Approbation als Arzt 1964 behielt ich meine Tätigkeit am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen bei.